

168445-041100

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application: 2001年 3月30日

出 願 番 号

Application Number: 特願2001-097966

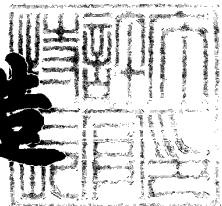
出 願 人

Applicant(s): 株式会社日立製作所

2001年11月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3105780

【書類名】 特許願

【整理番号】 D01001181A

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 21/64

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市戸塚区吉田町 2 9 2 番地 株式会社日立製作所生産技術研究所内

 【氏名】 押田 良忠

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立製作所計測器グループ内

 【氏名】 高橋 智

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立製作所計測器グループ内

 【氏名】 清野 太作

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県ひたちなか市市毛 8 8 2 番地 株式会社日立製作所計測器グループ内

 【氏名】 保田 健二

【特許出願人】

 【識別番号】 000005108

 【氏名又は名称】 株式会社 日立製作所

【代理人】

 【識別番号】 100075096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 作田 康夫

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 013088

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNA検査方法及びその装置並びに蛍光検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

複数L種の蛍光標識物質が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルに該蛍光標識物質に応じた複数M種の波長からなる微小なスポット励起光を照射し、該各蛍光標識物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出し、スポット励起光と当該スポット励起光が照射するサンプルの位置とを所望の領域に亘り相対的に前記蛍光標識物質の種類の数Lよりも少ない回数変化させることにより複数L種の蛍光標識物質が付加されたDNAを検査するDNA検査方法。

【請求項 2】

前記スポット励起光と当該スポット励起光が照射するサンプルの位置とを所望の領域に亘り相対的に変化させることを、1回だけ行うことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項 3】

上記複数M種の微小スポット励起光はそれぞれ複数Nの微小マルチスポット励起光であることを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

【請求項 4】

上記複数M種のマルチスポット励起光は互いにサンプル上で異なる位置を照射することを特徴とする請求項1乃至3の何れかに記載のDNA検査方法。

【請求項 5】

上記複数M種のマルチスポット励起光は同時に照射し、上記蛍光標識物質に応じた複数種の微小なスポット励起光により得られる蛍光をそれぞれの励起光に応じた複数個Kの微弱光検出素子で検出し、上記各蛍光標識物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出することを特徴とする請求項1乃至3の何れかに記載のDNA検査方法。

【請求項 6】

上記複数M種の微小なスポット励起光を励起光の波長に応じ時系列的に照射し、上記蛍光標識物質に応じた複数種の微小なスポット励起光により得られる蛍光

をそれぞれの励起光に対し共通の微弱光検出素子で検出し、上記各蛍光標識物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出することを特徴とする請求項 1 記載の DNA 検査方法。

【請求項 7】

上記複数 M 種の微小なスポット励起光はサンプル上でほぼ同一位置を照射することを特徴とする請求項 6 記載の DNA 検査方法。

【請求項 8】

上記複数 M 種の微小スポット励起光はスポット励起光と照射するサンプルの相対位置がほぼ 1 画素分変化する時間内において互いに異なる時間帯で点滅することを特徴とする請求項 1 記載の DNA 検査方法。

【請求項 9】

上記複数 M 種の微小スポット励起光はスポット励起光と照射するサンプルの相対位置がほぼ 1 画素分変化する時間内においてそれぞれ励起光強度レベルをステップ的に変化させ、各ステップ毎に蛍光強度を検出することにより、広いダイナミックレンジに亘る検出を高速に行うことを特徴とする請求項 1 記載の DNA 検査方法。

【請求項 10】

上記蛍光強度の分離検出はフォトンカウント法で行うことを特徴とする請求項 1 記載の DNA 検査方法。

【請求項 11】

複数 M 種の互いに異なる波長を有する光を出射する 1 ないし複数の光源と、該光源から複数波長の光をそれぞれ複数 L 種の蛍光標識物質が付加された DNA サンプルに微小なスポット励起光として照射せしめる複数波長励起光学系と、該各蛍光標識物質に応じて各々の励起光により得られる蛍光強度を分離検出する波長分離蛍光検出系と、上記微小なスポット励起光と上記 DNA サンプルの相対位置を所望の領域に亘り変化させる駆動ステージと、該相対位置の変化により 1 回上記所望の領域を走査し得られる蛍光検出情報と蛍光検出位置情報からサンプル上にある複数 L 種の蛍光標識 DNA の蛍光画像情報を構成する複数蛍光標識同時処理手段と、該複数蛍光標識同時処理手段で得られた情報を総合処理し検査結果を

記憶する手段と、当該記憶手段で記憶された結果を所望の出力形式で出力する出力手段からなるDNA検査装置。

【請求項 1 2】

上記微小なスポットは上記異なる各波長でN個のマルチスポットとなるよう構成された複数波長励起光学系であることを特徴とする請求項 1 1 記載のDNA検査装置。

【請求項 1 3】

上記光源もしくは複数波長励起光学系は各波長の励起光を交互に時系列的に点滅せしめる手段を具備したことを特徴とする請求項 1 1 記載のDNA検査装置。

【請求項 1 4】

上記光源もしくは複数波長励起光学系において各波長の励起光の強度を蛍光検出強度に応じ変化せしめる手段を具備したことを特徴とする請求項 1 1 記載のDNA検査装置。

【請求項 1 5】

上記波長分離蛍光検出系はフォトンカウント検出によることを特徴とする請求項 1 1 記載のDNA検査装置。

【請求項 1 6】

複数L種の蛍光発生物質を含むサンプルに該蛍光発生物質に応じた複数M種の波長からなる微小なスポット励起光を照射し、該各蛍光発生物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出し、スポット励起光と当該スポット励起光が照射するサンプルの位置とを相対的に所望の領域に亘り前記蛍光発生物質の種類Lよりも少ない数の回数変化させることにより複数L種の蛍光発生物質が付加されたサンプルを蛍光検出する蛍光検出方法。

【請求項 1 7】

前記スポット励起光と当該スポット励起光が照射するサンプルの位置とを相対的に所望の領域に亘り変化させることを、1回だけ行うことを特徴とする請求項 1 6 記載の蛍光検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は蛍光標識されたDNAまたは蛍光発生物質に励起光を照射し、DNA検査を行う方法及び装置または蛍光検出方法に関し、特に複数種の蛍光標識されたDNAまたは複数種の蛍光発生物質を高速に検出検査する方法及び装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

蛍光標識されたDNAに励起光を照射し、DNA検査を行う方法として、励起光であるレーザ光をシングルスポットビームとしてサンプルに絞り込み蛍光を検出し、励起光とサンプルの走査により蛍光画像を採取する方法があった。複数の蛍光標識の検出では先ず第1の励起光でサンプルの所望の全領域を走査し、第1の蛍光標識の蛍光画像を得て、しかる後に第2の励起光でサンプルの所望の全領域を再び走査し、第2の蛍光標識の蛍光画像を採取していた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

上記従来の方法では複数の蛍光標識に応じて波長を変えた励起光で所望の領域を走査し、この走査を複数標識の数だけ繰り返す。シングルスポットビームとサンプルの相対的な位置変化を行い所望の領域を高速に検査するにはサンプルを搭載したステージを高速に動かす必要がある。しかしステージを高速に動かせば往復運動が伴うため、ステージ駆動の加速減速にかなりの時間を要することになる。

【0004】

またステージ走査を励起光の波長ごとに繰り返して行くとステージの駆動精度、再現精度が十分でないと各励起光で得られる蛍光画像の合成像に位置ずれが生じる。この結果今後ますます必要となるDNA検査の高速化と、高精度化が達成できなくなる。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は上記の課題を解決するため以下に説明する手段を講じている。

【 0 0 0 6 】

複数L種の蛍光標識物質が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルに、この蛍光標識物質に応じた複数M種の微小なスポット励起光を照射する。この複数M種の微小なスポット励起光により各蛍光標識物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出する。この複数の蛍光標識の分離検出を、蛍光強度検出のため、スポット励起光が照射するサンプルの位置を所望の領域に亘り蛍光標識物質の種類の数Lよりも少ない回数、より好ましくは1回だけ変化させることにより行い、複数種の蛍光標識物質が付加されたDNAを検査する。すなわち従来の蛍光標識の数だけ変化、すなわち蛍光標識の数と同じ複数回走査させて複数種の蛍光標識物質を検査していたものを、蛍光標識の数よりも少ない回数、より好ましくは1回の変化、すなわち1回の走査で検査するものである。

【 0 0 0 7 】

さらに上記の複数種の微小スポット励起光をそれぞれ複数の微小マルチスポット励起光とすると、各蛍光標識について複数点を同時に検出することが可能になり高速検出が実現する。

【 0 0 0 8 】

上記複数種のマルチスポット励起光は互いにサンプル上で異なる位置を照射するようにすると、複数種の励起光により励起された各蛍光標識からの蛍光を互いに雑音となることなく精度よく分離検出することが可能となる。

【 0 0 0 9 】

上記複数種のマルチスポット励起光は同時に照射し、上記蛍光標識物質に応じた複数種の微小なスポット励起光により得られる蛍光をそれぞれの励起光に応じた複数個の微弱光検出素子で検出し、上記各蛍光標識物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出する。このようにすることにより特に微弱な蛍光を検出する際に用いるフォトンカウント法においてフォトンカウントを各蛍光で同時に行うことが可能になり高速に、かつ広いダイナミックレンジで検査することが可能になる。

【 0 0 1 0 】

上記複数種の微小なスポット励起光を励起光の波長に応じ時系列的に照射し、

上記蛍光標識物質に応じた複数種の微小なスポット励起光により得られる蛍光をそれぞれの励起光に対し共通の微弱光検出素子で検出し、上記各蛍光標識物質に応じて得られる蛍光強度を分離検出する。このようにすることにより特にマルチスポット検出では微弱光検出素子及びその周辺回路が安価になる。

【 0 0 1 1 】

上記複数種の微小なスポット励起光はサンプル上でほぼ同一位置を照射する。このようにすることにより各励起光での検出を同一場所で行うことができ、合成画像のステージのヨウイングやローリングに伴うずれは全く生じず、精度の高い検出が可能になる。

【 0 0 1 2 】

また上記複数種の微小スポット励起光はスポット励起光と照射するサンプルの相対位置がほぼ1画素分変化する時間内において互いに異なる時間帯で点滅する。このようにすることにより各蛍光標識を互いに雑音が乗ることなく精度よく検出することが可能になる。

【 0 0 1 3 】

上記複数種の微小スポット励起光はスポット励起光と照射するサンプルの相対位置がほぼ1画素分変化する時間内においてそれぞれ励起光強度レベルをステップ的に変化させ、各ステップ毎に蛍光強度を検出する。このようにすることにより広いダイナミックレンジに亘る検出を高速に行うことが可能になる。

【 0 0 1 4 】

本発明のDNA検査装置は下記の構成からなる。すなわち互いに異なる波長を有する光を出射する1ないし複数の光源と、該光源から複数波長の光をそれぞれ複数の蛍光標識物質が付加されたDNAサンプルに微小なスポット励起光として照射せしめる複数波長励起光学系を用いる。さらに各蛍光標識物質に応じて各々の励起光により得られる蛍光強度を分離検出する波長分離蛍光検出系を用いる。さらに上記微小なスポット励起光と上記DNAサンプルの相対位置を所望の領域に亘り変化させる駆動ステージを用いる。さらに駆動ステージを駆動して、微小なスポット励起光と上記DNAサンプルの相対位置を所望の領域に亘り変化させることを、蛍光標識物質の種類の数よりも少ない数の回数行うことにより、上記

検出系で得られた蛍光検出情報並びに該所望の領域に亘る蛍光標識物質の種類の数よりも少ない数の回数の走査でのステージ位置情報からサンプル上の複数蛍光標識DNAの画像情報を構成する処理装置を用いる。

【0015】

また本発明は蛍光標識されたDNAの検査のみならず、蛋白質等の分子特有の蛍光を発する一般的な蛍光発行物質にも同様に適応される。

【0016】

【発明の実施の形態】

図1は本発明の実施形態を表す図である。21, 22は後に図9を用いてその詳細を説明する励起光源及びサンプル上に微小なスポットを励起光として照射させるための複数波長励起光学系である。即ち、例えば21は635nmの半導体レーザ複数個からなる光源とこの光源から出射した光をサンプル上で微小なマルチスポットに照射させるための励起光学系の一部であり、22は532nmの波長を有するYAGレーザを光源とし、このレーザ光をサンプル上で微小なマルチスポットに照射させるための励起光学系の一部である。マルチスポット光の微小スポット数は64個、32個、16個、あるいは8個等、検査システムの仕様に応じて選択される。21, 22から出射する64個の635nm及び532nmのレーザビームはそれぞれ2101, 2201のビーム位置あわせ器により21A, 22Aの位置にそれぞれの波長で64個のマルチスポット空間像を形成する。このマルチスポット空間像はチューブレンズ、あるいは結像レンズ24と対物レンズ3によりサンプル基板5上に乗っているサンプルに図2に示すように21B, 22Bに示すマルチスポット励起光像を結像する。

【0017】

このスポットの詳細は図3に示すようにサンプル上で直径がd、ピッチがPyでM個（64個）並んでいる。21Bは635nmのマルチスポット、22Bは532nmのマルチスポットである。21Bと22Bの間隔Pxは本実施例では一致せず数十から数百ミクロンメートルあいている。この間隔は後述するように目標とする仕様によっては一致させる。

【0018】

図 1 の 3 1 及び 3 2 は波長選択ビームスプリッタであり、励起光の 6 3 5 n m と 5 3 2 n m の波長の光は透過する。サンプル上の蛍光物質をマルチスポットで励起すると、この励起微小スポットの位置、2 1 0 1, 2 1 0 2、……2 1 M に照射される 6 3 5 n m (波長 λ_1) の励起光を吸収し蛍光を発する蛍光物質 M L 1 が存在すればこの波長よりやや長い波長 λ_1' の蛍光が生じる。発生した蛍光は図 4 にも示すように高 N A の対物レンズ 3 を通り、2 個の矢印を持つ点線のように進み、波長選択ビームスプリッタ 3 2 で反射し、3 2 と同様の波長選択特性を有する 3 3 と 3 4 (又は反射率の高いミラー 3 3' と後述の蛍光 λ_2' を透過し λ_1' を反射する 3 4') で反射し、後にその詳細を図 5 から図 8 を用いて説明する波長分離蛍光検出系 1 0 0 に入射する。波長選択特性を有する 3 3 と 3 4 で反射することにより励起光 λ_1 と λ_2 をかなりカットする。

【 0 0 1 9 】

他方マルチスポット励起光は λ_1 とは異なる波長である 5 3 2 n m (波長 λ_2) の励起光を 2 2 0 1, 2 2 0 2、……2 2 M に照射する。このマルチスポット励起光を吸収し、蛍光を発する蛍光物質 M L 2 が存在すればこの波長よりやや長い波長 λ_2' の蛍光が生じる。発生した蛍光は高 N A の対物レンズ 3 を通り、2 個の矢印を持つ 2 点鎖線のように進み、波長選択ビームスプリッタ 3 2 を透過し、波長選択ビームスプリッタ 3 1 で反射し、波長選択ビームスプリッタ 3 4 (または 3 4') を透過し、波長分離蛍光検出系 1 0 0 に入射する。波長選択ビームスプリッタ 3 1 で反射し、波長選択ビームスプリッタ 3 4 または 3 4' を透過することにより励起光 λ_1 と λ_2 をかなりカットする。

【 0 0 2 0 】

複数波長のマルチスポット励起光とサンプルの相対位置を 1 回だけ走査し、図 1 の波長分離検出系 1 0 0 で、検出された複数の標識蛍光または蛍光物質の情報はメモリ 1 1 に一旦記憶される。図 1 の入力端末 1 3 より所望の検査仕様、例えば検査領域の座標範囲、検査対象に関する情報、出力の条件等々を入力して置くと、この条件に合った検出が行われると共に、得られた検出結果から所望の出力が例えばディスプレイモニタ 1 2 に出力される。またこの結果を離れた位置にある伝達したい場所に回線 1 4 を介して送信することもできる。上記の装置の条件

入力、励起光、ステージ、フォトマル検出の制御、結果の処理、結果の出力等は図 1 の制御装置 1 でコントロールされる。

【0 0 2 1】

図 5 は波長分離蛍光検出系 1 0 0 の実施形態例である。1 0 0 1 はリレイレンズあるいは結像レンズである。異なる蛍光物質 ML 1 と ML 2 で発生した蛍光はレンズ 1 0 0 1 を通過後、干渉フィルタ 1 2 1 1, 1 2 2 1 の位置ではその光束の位置が分離している。この分離は両励起光がサンプルを照射する位置をずらすことによって実現する。また波長選択ビームスプリッタ 3 3, 3 4 の位置や角度の調整によっても実現する。分離した蛍光 λ 1、 λ 2 はそれぞれ干渉フィルタ 1 2 1 1, 1 2 2 1 を通過することにより、さらに励起光成分をきわめてわずかにし、蛍光検出の雑音を除去する。

【0 0 2 2】

干渉フィルタを通過した蛍光 λ 1' と λ 2' はそれぞれ波長選択ミラー 1 2 1 2, 1 2 2 2 (又はブロードバンドの高反射ミラー 1 2 1 2', 1 2 2 2') で反射し、図 6 に示すマルチチャンネルフォトマル 1 0 1 に入射する。波長選択ミラー 1 2 1 2, 1 2 2 2 は励起光成分を透過し、蛍光を反射するため、反射後の励起光成分は 0 と見なせるほどきわめて少なくなっている。波長選択ミラー 1 2 1 2, 1 2 2 2 は図に示すようにそれぞれの反射面が 1 平面上になく、角度がついているため、ここを反射した両蛍光は共に図 6 に示すようにマルチチャンネルフォトマル 1 0 1 の前面に付けた 1 列状のピンホールアレイのピンホール上又はスリット上に結像する。

【0 0 2 3】

図 7 はマルチチャンネルフォトマル 1 0 1 がアレイ方向と直角な方向に長い場合に可能な検出方法を示した実施形態である。この場合図 5 の波長選択ミラー 1 2 1 2, 1 2 2 2 のミラー面を 1 平面上に設置することになる。またこのミラーに至るまでに十分励起光がカットできていれば、1 個の通常のみラーを用いてもよい。

【0 0 2 4】

本実施形態では複数の蛍光を 1 つのフォトマル (マルチチャンネルフォトマル

） 1 0 1 で検出するため励起光を異なる時間帯で点滅させる。励起光源である波長 6 3 5 n m の半導体レーザ（複数）はレーザを駆動する電源の信号を O N - O F F する事により点滅を実現する。他方 2 2 の中にある Y A G レーザのビームは図示されていない A O 変調器（Acoust-Optic Modulator）を用いて O N - O F F される。

【 0 0 2 5 】

6 3 5 n m の励起光の強度 I 2 1 と 5 3 2 n m の励起光強度 I 2 2 は図 1 0 の（A 1）（B 1）に示すように互いに点滅する時間帯を異にして点滅する。これらの励起光の点灯時間は数十～数百 μ s である。ほとんどの蛍光物質においては励起後の蛍光発生遅延時間が数 n s ～数百 n s であるのでほぼ励起光照射時間と一致して蛍光が発生する。。従って図 1 0 の（A 2）及び（B 2）に示すように励起光点滅と同期させてそれぞれの蛍光を検出する。図 1 0 （C）は励起光の点滅と同期してサンプルをホールドし、異なる位置で蛍光検出するためのステージ移動量あるいはステージ位置情報 S t との関係を示している。即ち上記の 2 励起光の点滅により 6 4 スポットの蛍光を検出する時間 Δt の間に Δx 移動する。この移動距離がスポット径 d 相当の大きさにすることにより走査と点滅により所望の領域を蛍光検出することが可能になる。

【 0 0 2 6 】

図 8 は本発明の複数波長の励起光を同時に照射し、同時に蛍光検出する場合の実施形態である。この場合には D N A サンプル、あるいは蛍光物質サンプルに 2 つ（あるいは 3 つ以上）の励起光を同時に、かつ同一場所（異なる場所でも良い）に照射する。各波長の励起光を同一場所に照射する場合には、図 1 で示す波長選択ビームスプリッタ 3 1 と 3 4 の位置と傾きを予め調整しておく。このようにすることにより、例えば 6 3 5 n m の励起光による蛍光は図 8 の干渉フィルタ 1 2 1 1 を、5 3 2 n m の励起光による蛍光は図 8 の干渉フィルタ 1 2 2 1 を透過するようにできる。この結果、それぞれの蛍光をミラー 1 2 1 2 ' と 1 2 2 2 ' で反射させ、異なるマルチチャンネルフォトマル 1 0 1 1 と 1 0 1 2 に入射させ、分離して同時に蛍光を検出することが可能になる。

【 0 0 2 7 】

図9は本発明の実施形態を表す図であり、3種の励起光を用いる例である。210は635nm（波長 $\lambda 11$ ）の半導体レーザを用いるマルチスポット励起光学系、220は590～600nm（波長 $\lambda 12$ ）の波長を用いるマルチスポット励起光学系、230は532nm（波長 $\lambda 13$ ）のレーザを用いるマルチスポット励起光学系である。それぞれの光源から出射した光をマルチスポットにする方法を210により用いて説明する。

【0028】

光源から出射したビームはビーム整形器211により所望のビーム径とビーム広がり角になり、偏光器211で所望の偏光状態になり、ビーム分割器213, 214, 215を通過していく。これらビーム分割器は2等分直角三角形の斜辺と頂角が45度の平行四辺形の斜辺が張り合わされ、この貼り合わせ面がビームスプリット面である。また平行四辺形の貼り合わされた面と対向する面までの距離は213のビーム分割器がdであるとする、214と215のビーム分割器ではそれぞれ2dと4dになっている。この結果ビーム分割器215を通過するビームは8本になっており、各ビームの間隔は $\sqrt{2}d$ になっている。8本になったビームは凸レンズアレー2161～2168により21A-21B線2100上に所望のビーム径のマルチスポットを形成する。

【0029】

図9の220および230も上記のこのような構成からなるマルチスポット励起光学系である。波長選択ビームスプリッタ202は波長 $\lambda 12$ の励起光を通過させ、波長 $\lambda 13$ の励起光を反射する。波長選択ビームスプリッタ201は波長 $\lambda 12$ と波長 $\lambda 13$ の励起光を通過させ、波長 $\lambda 11$ の励起光を反射する。

【0030】

3つの波長の励起光は複屈折材料である、例えば方解石からなるビームスプリッタ203, 205および波長板204および206によりそれぞれ8本からなるマルチビームが4倍の32本になり、21A-21Bの面上の直線2200および2300に所望のビーム系でマルチスポットを形成する。この空間内の直線2100, 2200および2300上にできた3つの励起光からなるマルチスポットはチューブレンズ24および図1で説明した対物レンズ3によりサンプル5

に所望のスポット径で励起光を照射する。

【 0 0 3 1 】

図 1 1 は本発明の励起波長が 2 つの場合の実施形態である。蛍光検出のダイナミックレンジを大きく採るには励起光強度変えて検出する必要がある。即ち検出対象の単位面積当りの蛍光分子数が、例えば $1 \text{ 分子} / \mu \text{ m}^2 \sim 1 \text{ 万分子} / \mu \text{ m}^2$ ときわめて少ないものから多いものまでを検出しようとするするとフォトマル等の高感度検出器の検出分解能（検出範囲／雑音レベル）を超えてしまう。そこで図 11 に示す方法によりこの課題を解決する。図 1 1 の（A 1）および（B 1）は横軸が時間、縦軸はそれぞれ励起波長 λ_1 と λ_2 の励起光のサンプル上での強度を表している。本実施形態では励起光 λ_1 と λ_2 での検出を時系列的に行っているが、以下の説明は同時に行う場合にも同じようにできる。時刻 t_0 から時刻 t_2 の間は励起光 λ_1 で励起し、検出する。時刻 t_0 から t_1 までの間は励起光強度 I_{21}' は強い光 I_{1A} で、時刻 t_1 から t_2 までの間は励起光強度 I_{21}' は弱い光 I_{1B} で励起する。図 11（A 2）と（B 2）に示すようにそれぞれの時間帯 $t_0 - t_1$ および $t_1 - t_2$ に励起光強度 I_{1A} と I_{1B} における蛍光を検出する。

【 0 0 3 2 】

同様に時刻 t_2 から t_4 までには図 11 の（B 1）に示すように λ_2 の励起光に対し励起光強度 I_{22}' が t_2 から t_3 は I_{2A} 、 t_3 から t_4 は I_{2B} になるようにし、図 11 の（B 2）に示すようにこの時間帯にそれぞれの蛍光強度を検出する。

【 0 0 3 3 】

図 1 2 は非常に蛍光分子が少ない場合から多い場合にも適応できるフォトマル信号の検出方式を示している。蛍光分子が少ない場合にはフォトンカウント法を適用する。フォトンカウント法は光が弱くなり光子が検出時間内にフォトンパルスが数カウントから数百ないし数千カウント程度の場合に有効な検出法である。逆に蛍光が非常に大きくなるとフォトンパルスがパルス信号の時間幅以内に頻繁に検出されるとパルスを正確に計測できなくなる。このような場合に上記図 1 1 で説明したように励起光強度桁違いに小さくして励起照射すれば、フォトンパル

スの重なりは少なくなり、蛍光検出が可能になる。

【0034】

図12(A1)は図11(A1)と同用の図であるが、横軸の時間軸を拡大したものである。本実施形態ではサンプルと励起光を相対的に走査をしながら3種の蛍光分子を同時に検出する例である。即ち2種あるいは3種の励起光をサンプルに図12(A1)に示すように同時に照射する。それぞれの励起光強度の相対値は I_{1A} 、 I_{2A} 、(及び I_{3A})とけた違いに弱い強度の I_{1B} 、 I_{2B} (及び I_{3B})である。3種の蛍光物質 L_1 、 L_2 及び L_3 から得られる蛍光のフォトンカウントパルスを図12(C1)、(C2)及び(C3)に示す。蛍光物質 L_1 は中程度の蛍光強度、 L_2 は弱い蛍光強度、 L_3 は非常に強い蛍光強度の場合である。

【0035】

パルスカウントの方法には大きく2つの方法がある。図12にあるようにパルス幅が大きなものでも1パルスとして計測する第1の方法とパルス信号がハイレベルにある時間を測る第2の方法である。第1の方法ではパルス数が大きくなると計数値が逆に小さくなり、検出強度とパルス計数値の関係が1価関数とならず計数値を特定できない。これに対し第2の方法はパルス数が大きくなっても計数値が小さくなることはなく、1価関数となり、刑すうちに補正を加えることにより正しい計測ができる。第2の方法はより正確な計数ができるが、パルスの幅が小さくなると計数回路の時定数を非常に小さくしないと正確な計数が困難になる。

【0036】

図12の実施形態では強い励起光と弱い励起光を照射しそれぞれのフォトンカウントを行うので、強弱の励起光でのそれぞれの計数値から1価関数が得られない第1の方法でもほぼ誤らずに計数を行うことができる。即ち、例えば図12(C1)の場合 t_0-t_1 時間で得られる計数値と t_1-t_2 時間とが大きく変わらなければ、後者の値が正しいことがわかる。また図12(C3)のように t_0-t_1 時間で得られる計数値が小さく、 t_1-t_2 時間で得られる計数値が大きければ後者の値が正しいことが分かる。他方図12(C2)のように t_1-t_2

時間で得られる計数値がほとんど0であれば $t_0 - t_1$ 時間で得られる計数値が正しいことが分かる。

【0037】

更に大きなダイナミックレンジが必要な場合には図11と図12(A1)に示した励起光強度を非常に強い、中程度、及び非常に弱い励起光と3段階にすることにより広いダイナミックレンジの検出が可能になる。

【0038】

図13は本発明の実施形態を示す図である。図13は蛍光検出の部分のみを表している。励起光照射光学系は図9の3つの励起光2100、2200及び2300が同一光路に成るよう波長選択ビームスプリッタ201と202の位置あわせが行われている。図1に示すサンプル5に3つの異なる波長のマルチスポット励起光2100'、2200'及び2300'を同一場所に照射し、得られる蛍光L1、L2及びL3を下記のように検出する。L1は図1の波長選択ビームスプリッタ32と34で反射させ、L2とL3は波長選択ビームスプリッタ32を透過させ、31で反射させ34を透過させ、図13に示す蛍光検出に導く。サンプル上のマルチスポット励起光から得られる蛍光は図1の対物レンズ3と図13のチューブレンズ1001により、マルチチャンネルフォトマル1011、1012及び1013の受光部にマルチスポット像として結像する。3蛍光標識から得られる蛍光は図13の波長分離ビームスプリッタ1231と1232により分離される。即ち、励起光2100'から得られる蛍光L1は波長分離ビームスプリッタ1231で反射し、この蛍光のみを透過する干渉フィルタ1241を通り、マルチピンホールアレイ1010の開口を通過しマルチチャンネルフォトマル1011で検出される。同様に蛍光L2は波長選択ビームスプリッタ1231を通過し、蛍光L2は波長選択ビームスプリッタ1232を透過し、蛍光L3はここで反射し、それぞれ干渉フィルタ1242及び1243を透過後に、それぞれマルチチャンネルフォトマル1012と1013で検出される。

【0039】

上記の図13の実施形態では励起光として3つの波長を用いているが、励起光を2つの波長にし、3つの蛍光物質を検出することも可能である。即ち励起光と

して波長 6 3 5 n m の半導体レーザと 5 3 2 n m の Y A G S H G レーザを用い、蛍光物質として C y 5、C y 3、5 及び C y 3 を検出する。この場合それぞれの蛍光スペクトルのピーク値は 6 7 0 n m、5 7 0 n m 及び 6 0 0 n m の近辺にあるので、波長選択ビームスプリッタ 1 2 3 1 は 6 5 0 n m 以上を反射させ、この波長以下では透過するようにする。また波長選択ビームスプリッタ 1 2 3 2 は波長 5 8 5 n m 以下は反射し、この波長以下は透過するようにする。

【0 0 4 0】

以上説明したような蛍光検出をすることにより、励起光とサンプルを所望の、例えばスライドガラスの 2 0 × 4 0 m m の領域に亘り、励起光とスライドガラスを相対的に 1 回走査するだけで複数の蛍光物質の濃度を蛍光検出強度として検出することが可能になる。

【0 0 4 1】

上記の実施形態の説明では励起光としてマルチスポットアレイを例にしているが、シングルスポットでも、あるいは走査方向と直交する方向に長細いシート状の励起光でも同様に高速に検出できる。

【0 0 4 2】

【発明の効果】

本発明により複数の種類の蛍光標識からなる D N A 被検査対象、あるいは複数の種類の蛍光物質を含むサンプルを検出したい広がり内を蛍光標識あるいは蛍光物質を含むサンプルの種類の数よりも少ない回数の走査で、より好ましくは 1 回の走査で検出することが可能になり、従来に比べ格段に早い検出が可能になった。この結果大量の検査対象を高速に検出、検査することが可能になり、非常に大きい時間的、経済的效果が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明による D N A 検査装置の全体の概略構成を示す斜視図である。

【図 2】

本発明による検出視野内のマルチスポット励起光を示す平面図である。

【図 3】

本発明によるマルチスポット励起光の拡大平面図である。

【図 4】

本発明による励起光と蛍光の経路を示す光学系の一部の正面図である。

【図 5】

本発明による蛍光検出光学系の 1 例を示す正面図である。

【図 6】

本発明によるフォトマル上の蛍光検出スポットの一例を示すフォトマルの正面図である。

【図 7】

本発明によるフォトマル上の蛍光検出スポットの他の例を示すフォトマルの正面図である。

【図 8】

本発明による複数の蛍光とフォトマルの関係を表す図である。

【図 9】

本発明による複数波長励起光学系の斜視図である。

【図 1 0】

本発明による励起光強度の時間変化と検出のタイミングの関係を表すグラフである。

【図 1 1】

本発明による励起光強度の時間変化と検出のタイミングの関係を表すグラフである。

【図 1 2】

本発明によるフォトンカウント検出法を表すグラフである。

【図 1 3】

本発明による蛍光検出部の斜視図である。

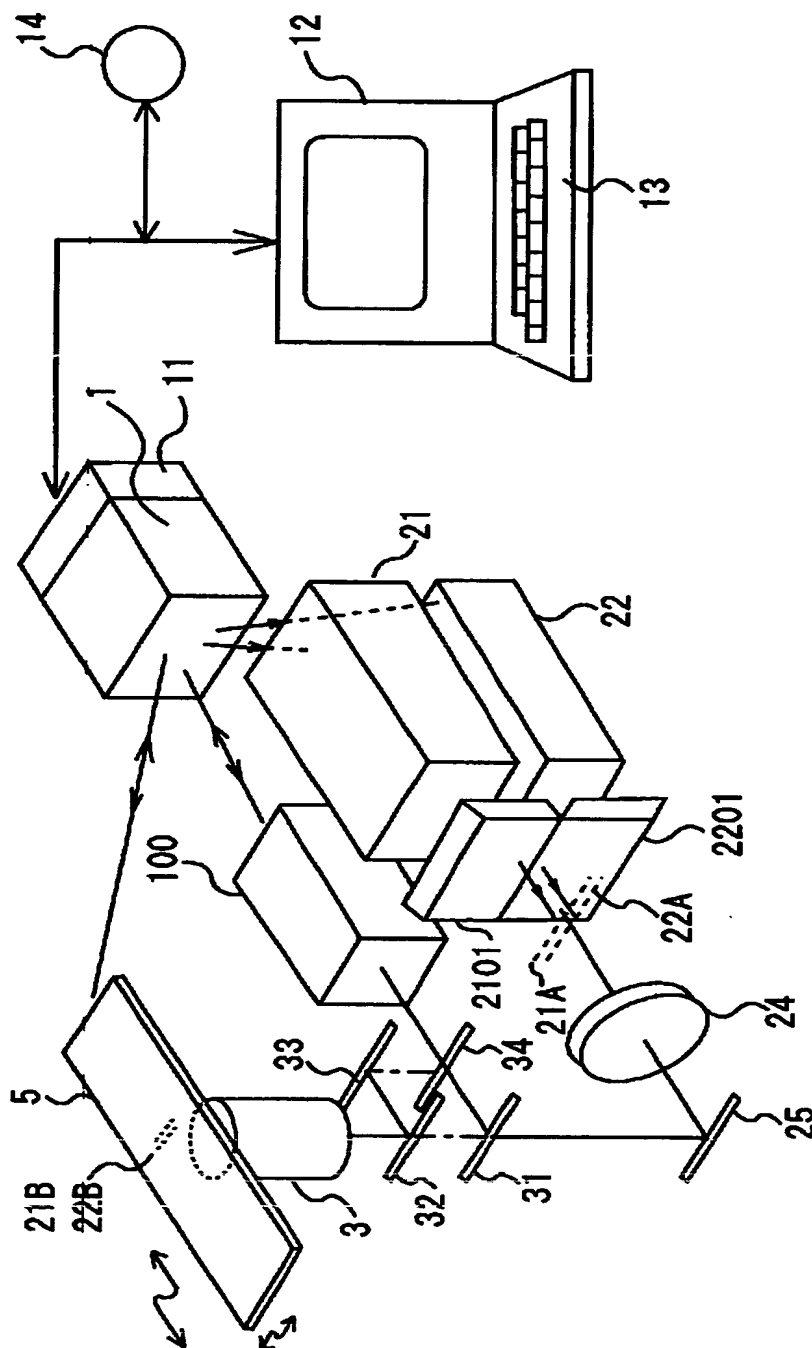
【符号の説明】

1 … 制御装置 2 1, 2 2 … 励起光源を含む複数波長励起光学系 2 4 … レンズ 3 … 対物レンズ 3 1, 3 2, 3 4 … 波長選択ビームスプリッタ
1 0 0 … 蛍光検出光学系 5 … 蛍光標識もしくは蛍光体を含むサンプル

【書類名】 図面

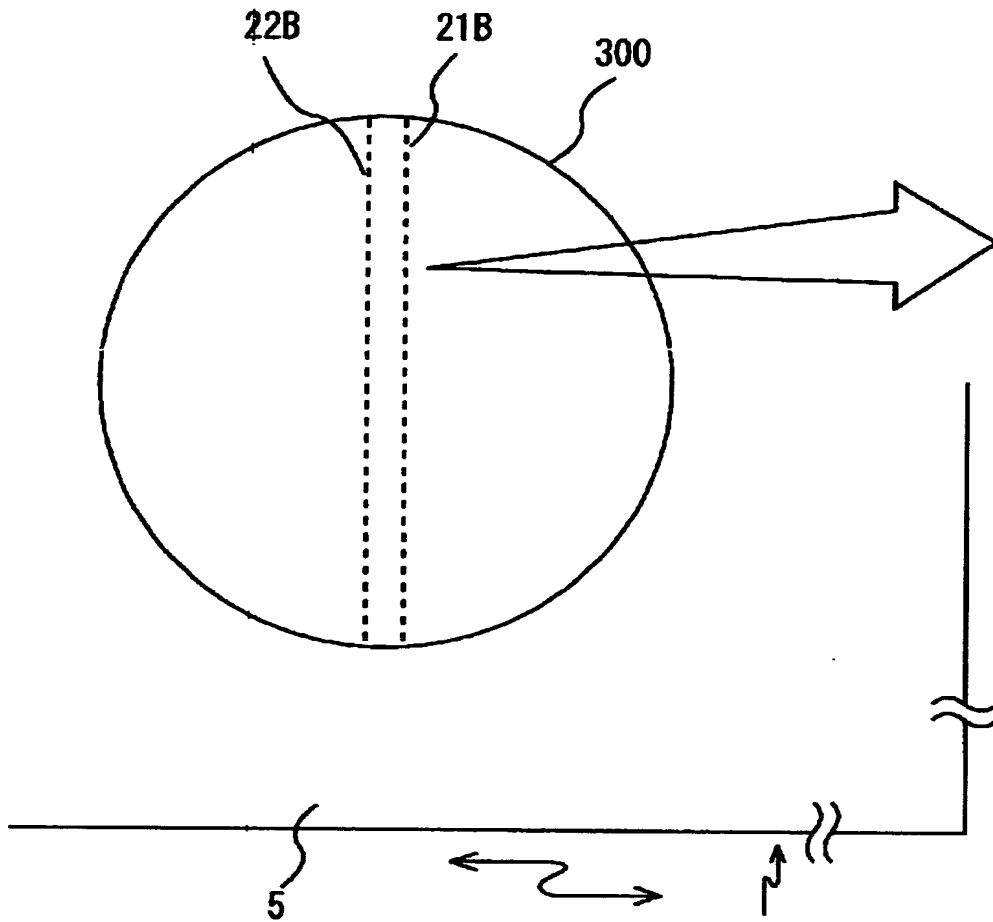
【図 1】

図 1



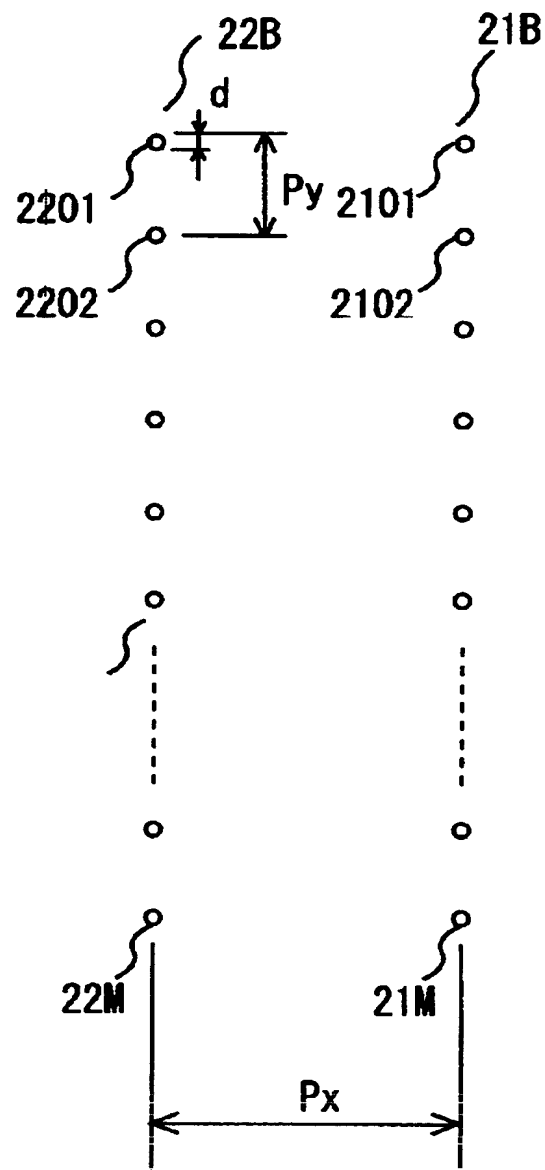
【図 2】

図 2



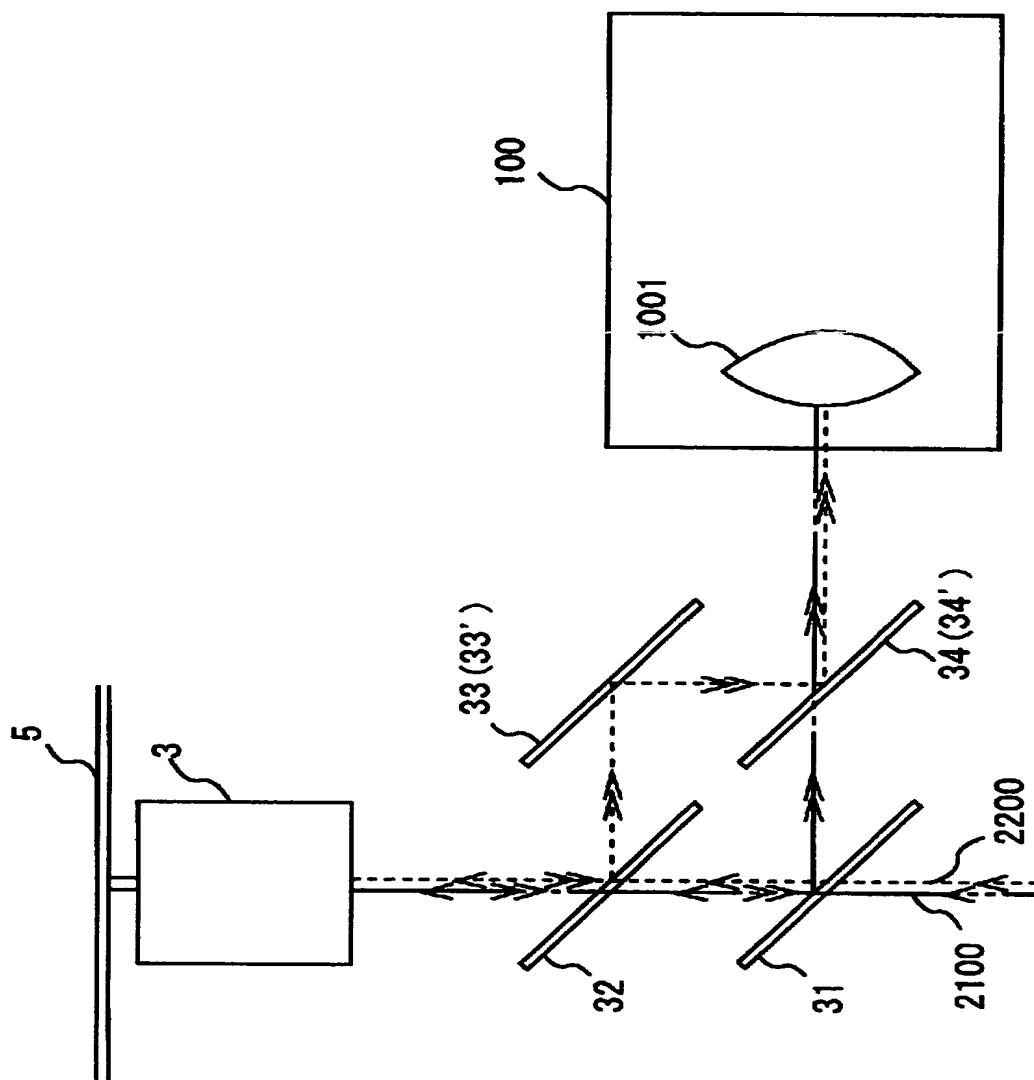
【図 3】

図 3



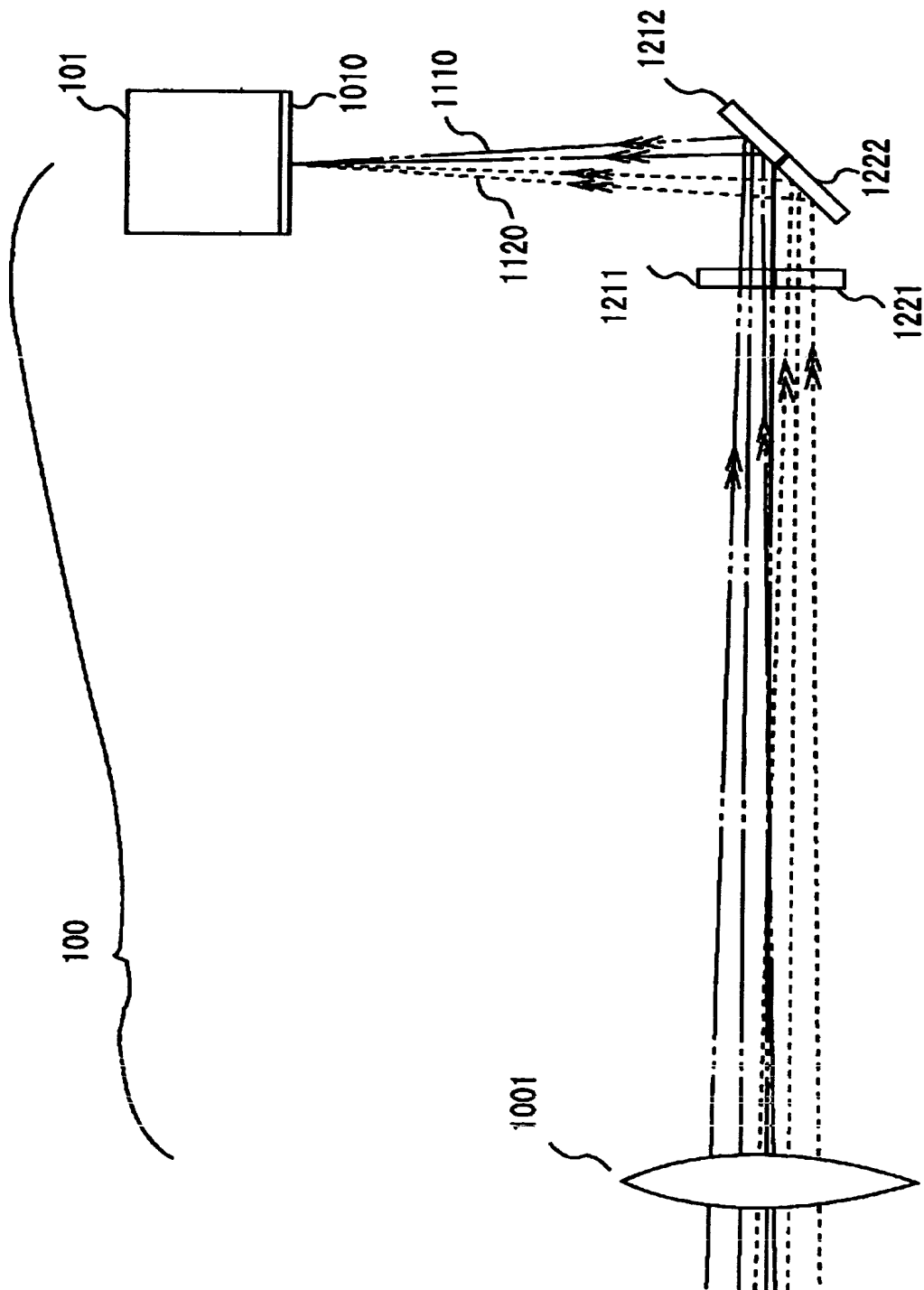
【図 4】

図 4



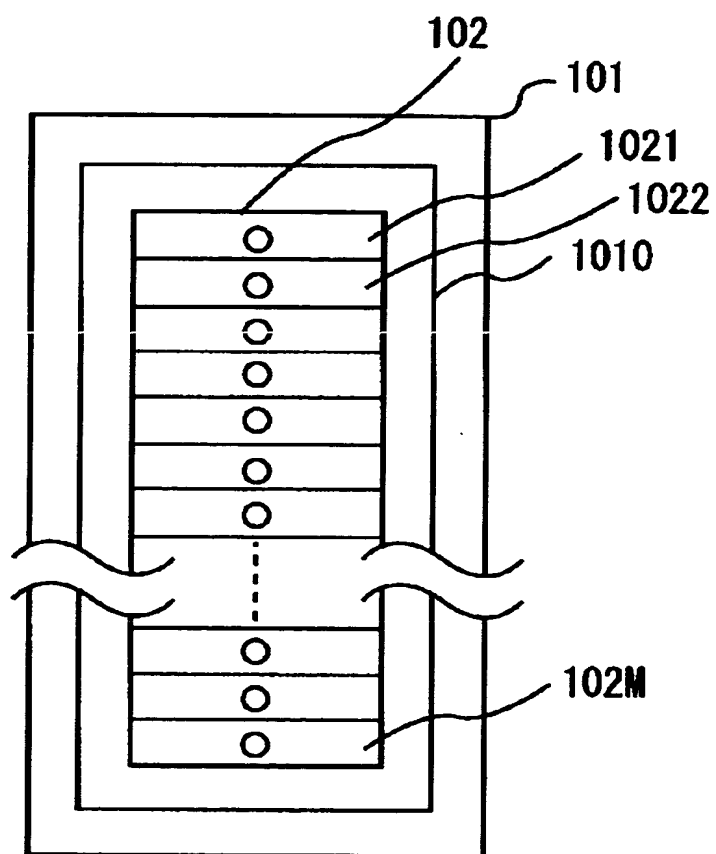
【図 5】

図 5



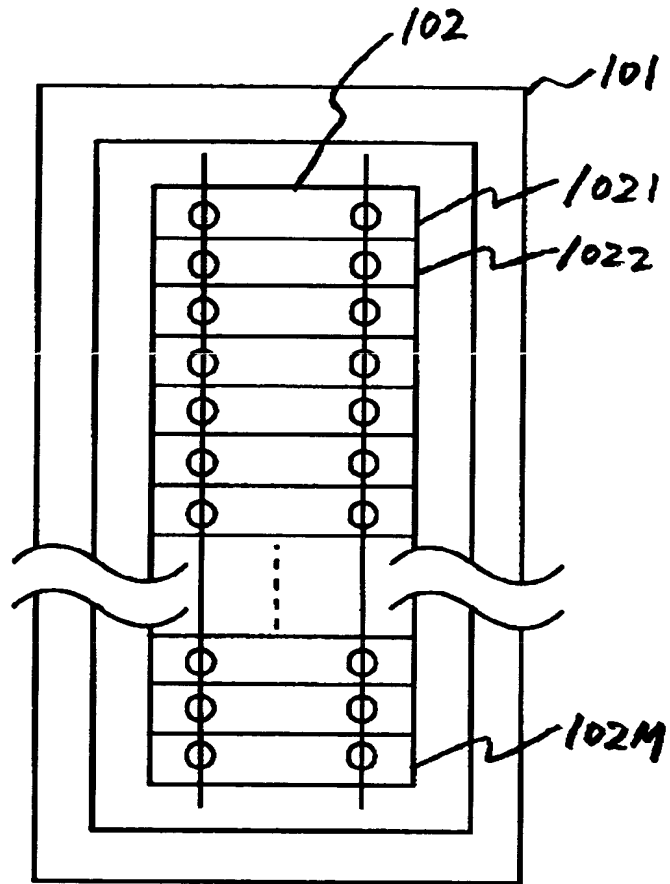
【図 6】

図 6



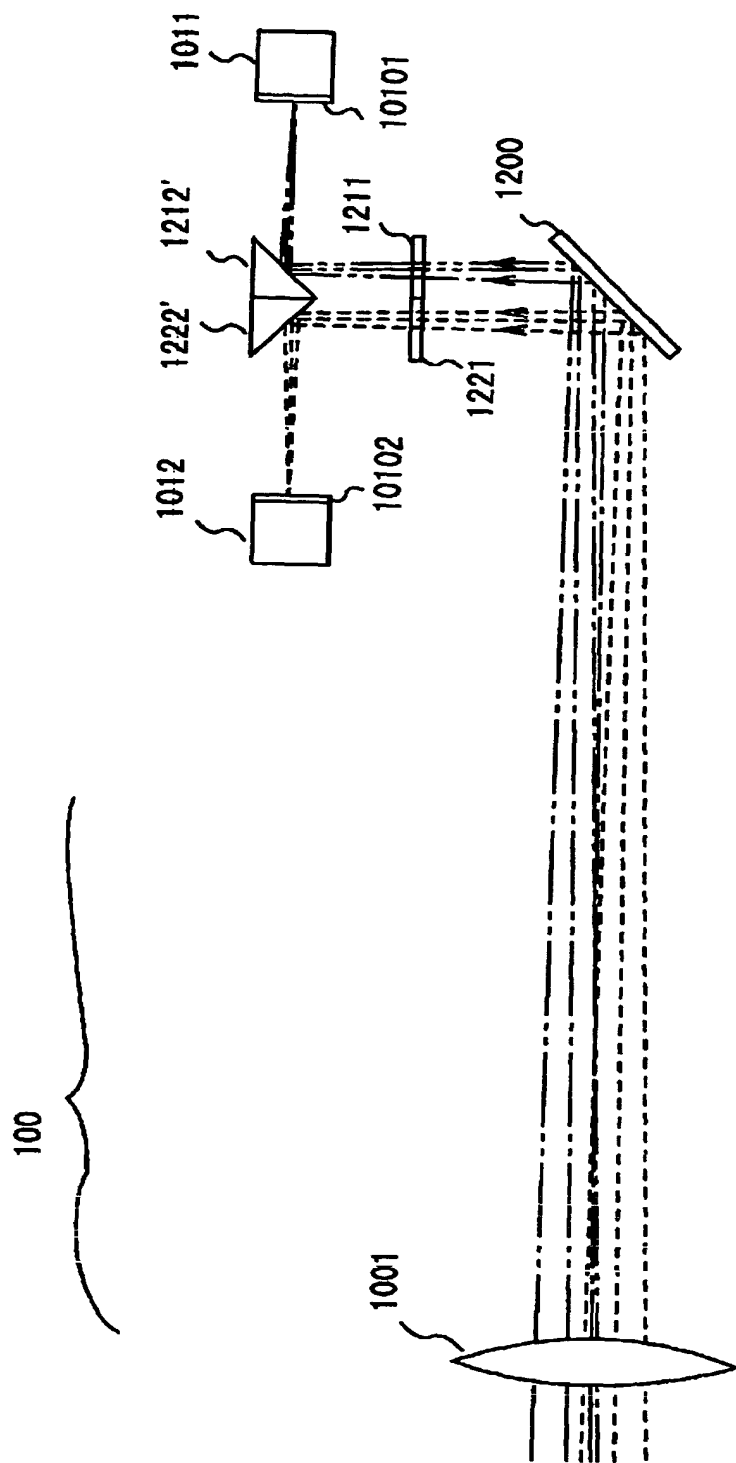
【図 7】

図 7



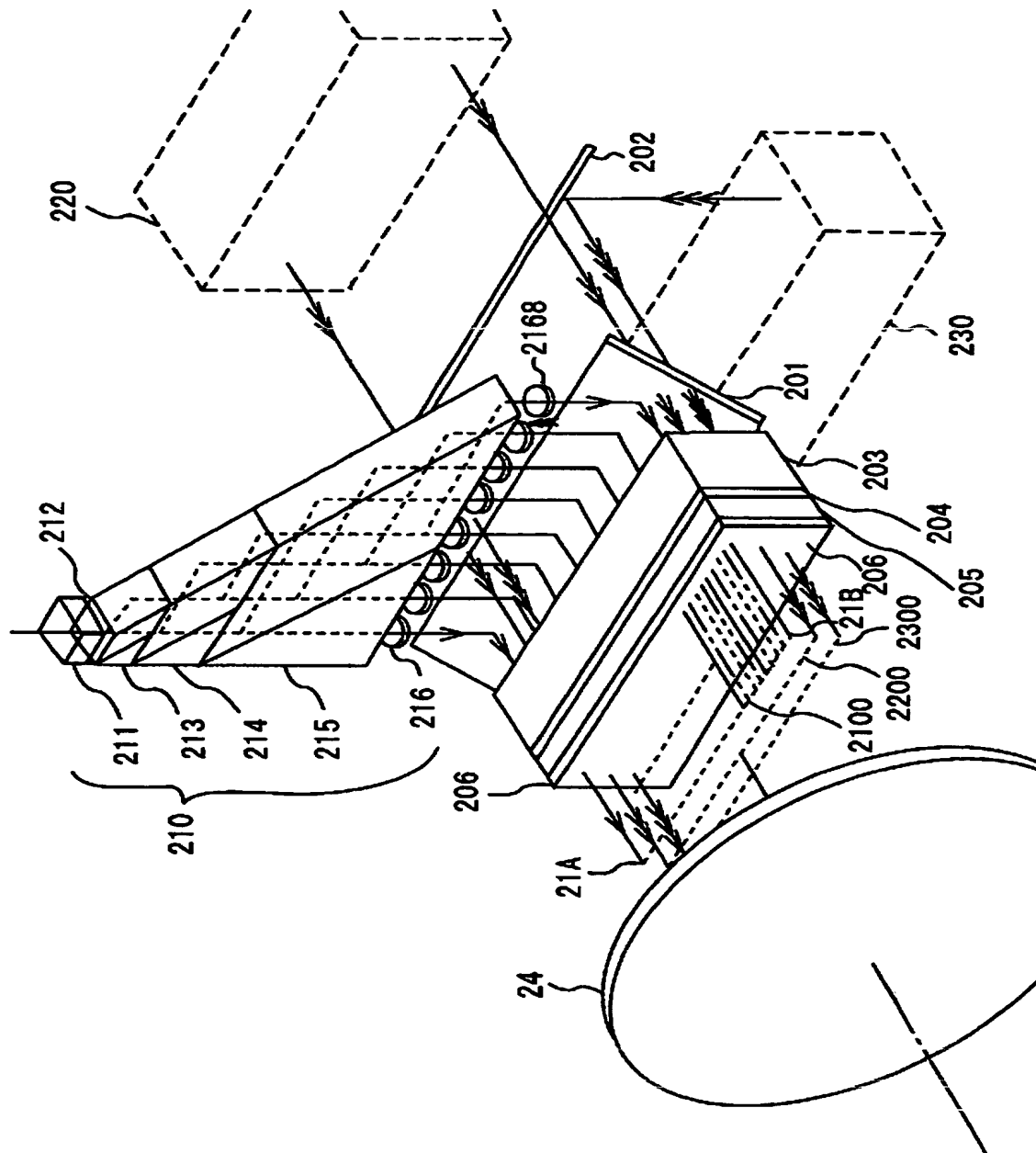
【図8】

図 8



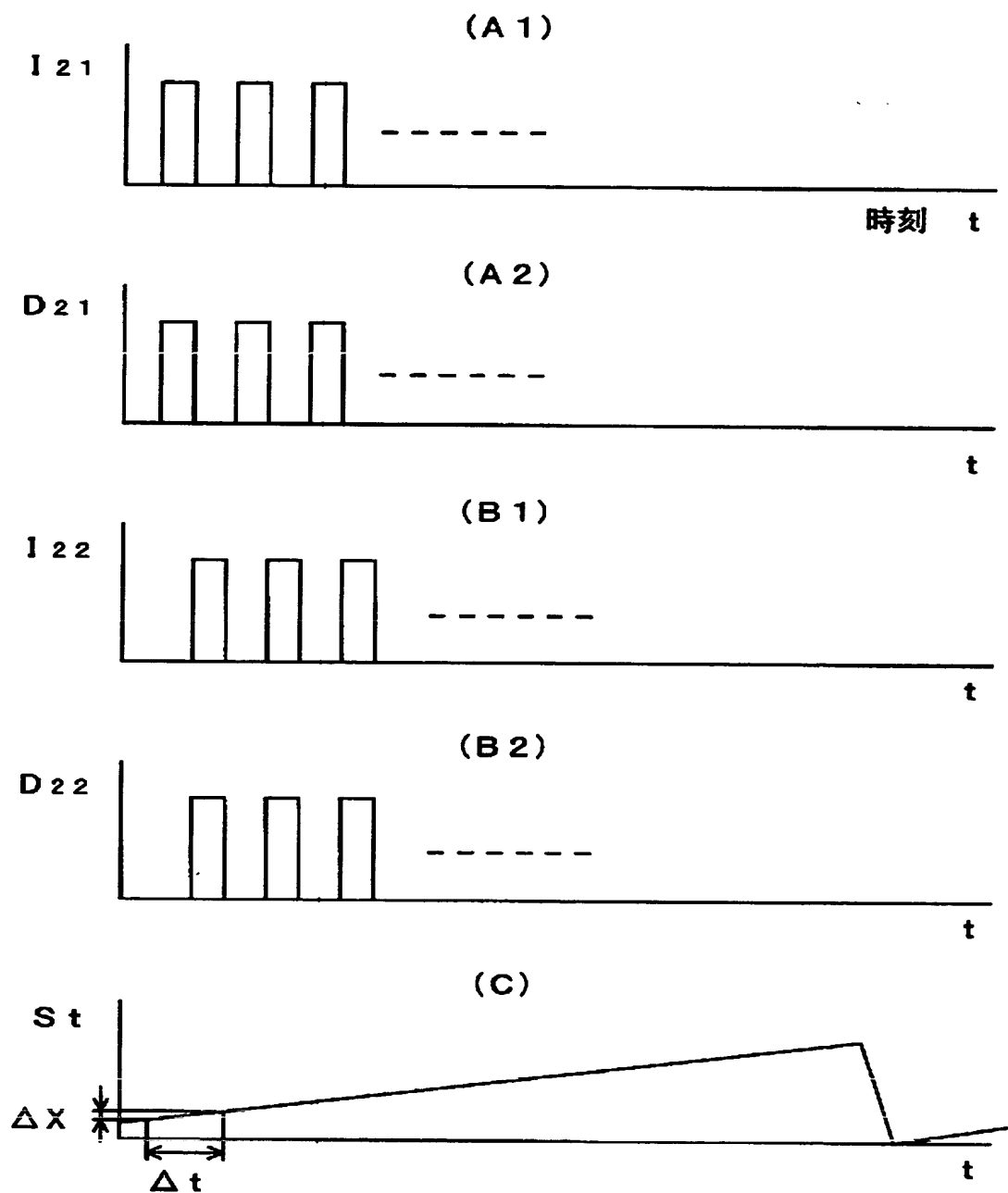
【図9】

図9



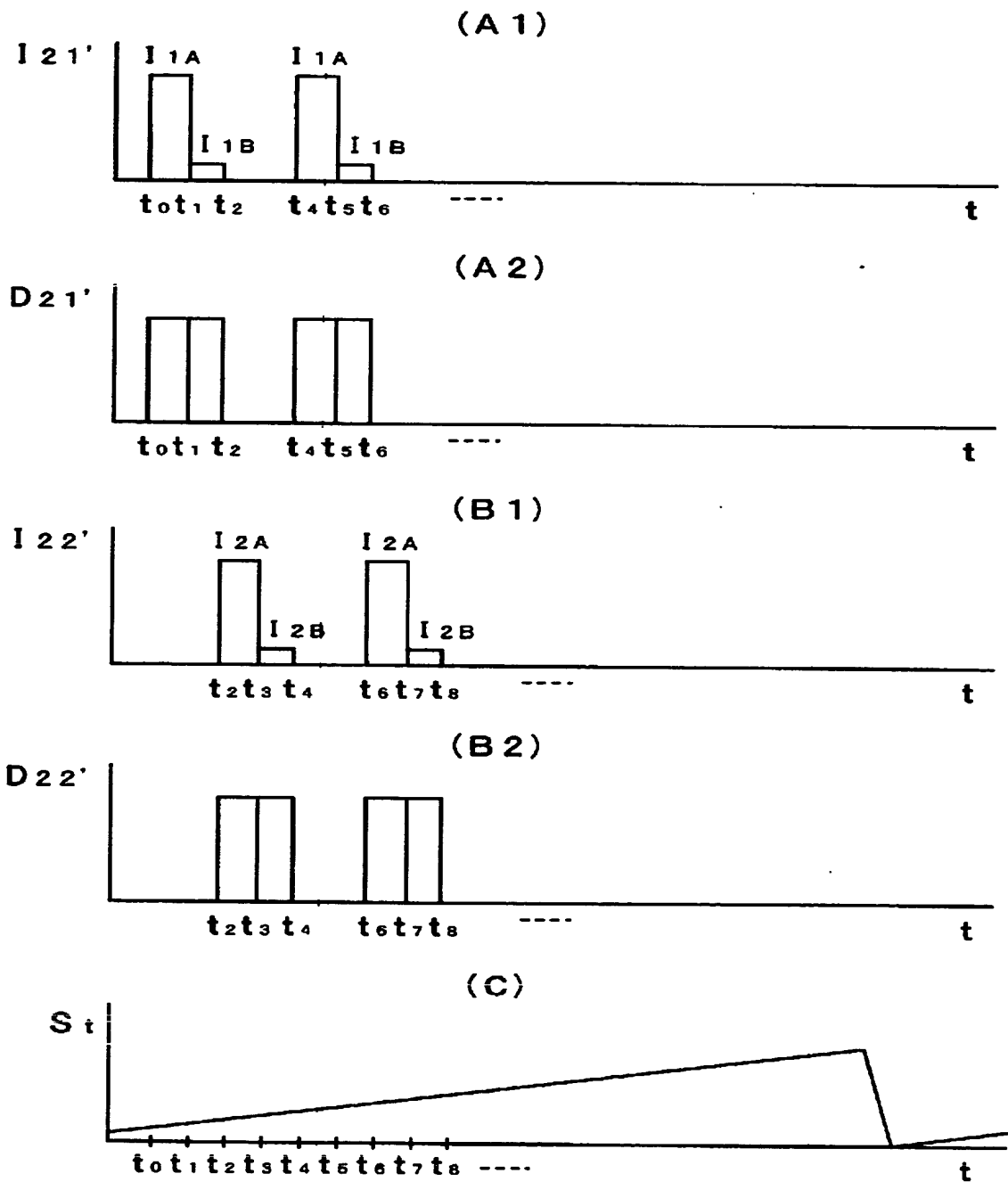
【図 10】

図 10



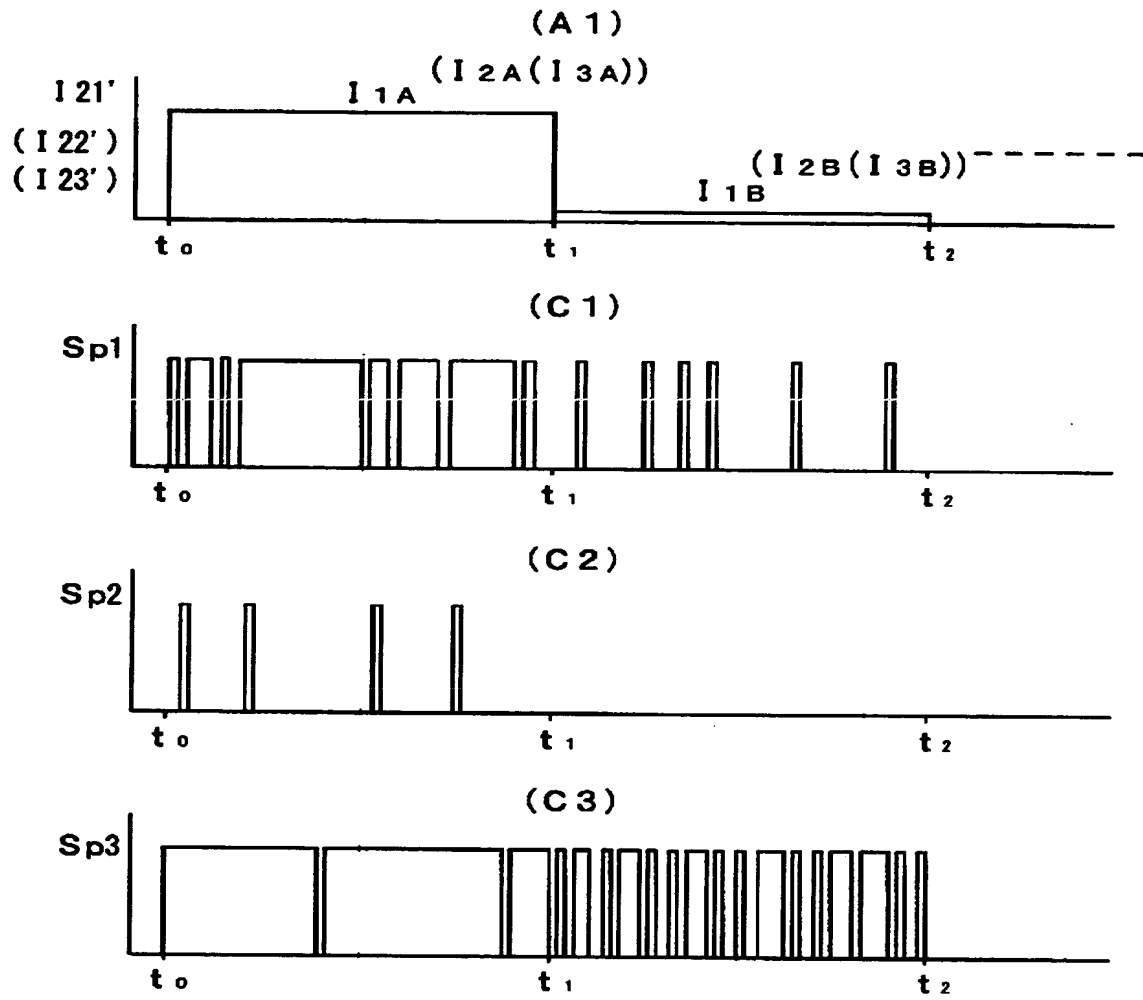
【図11】

図 1 1



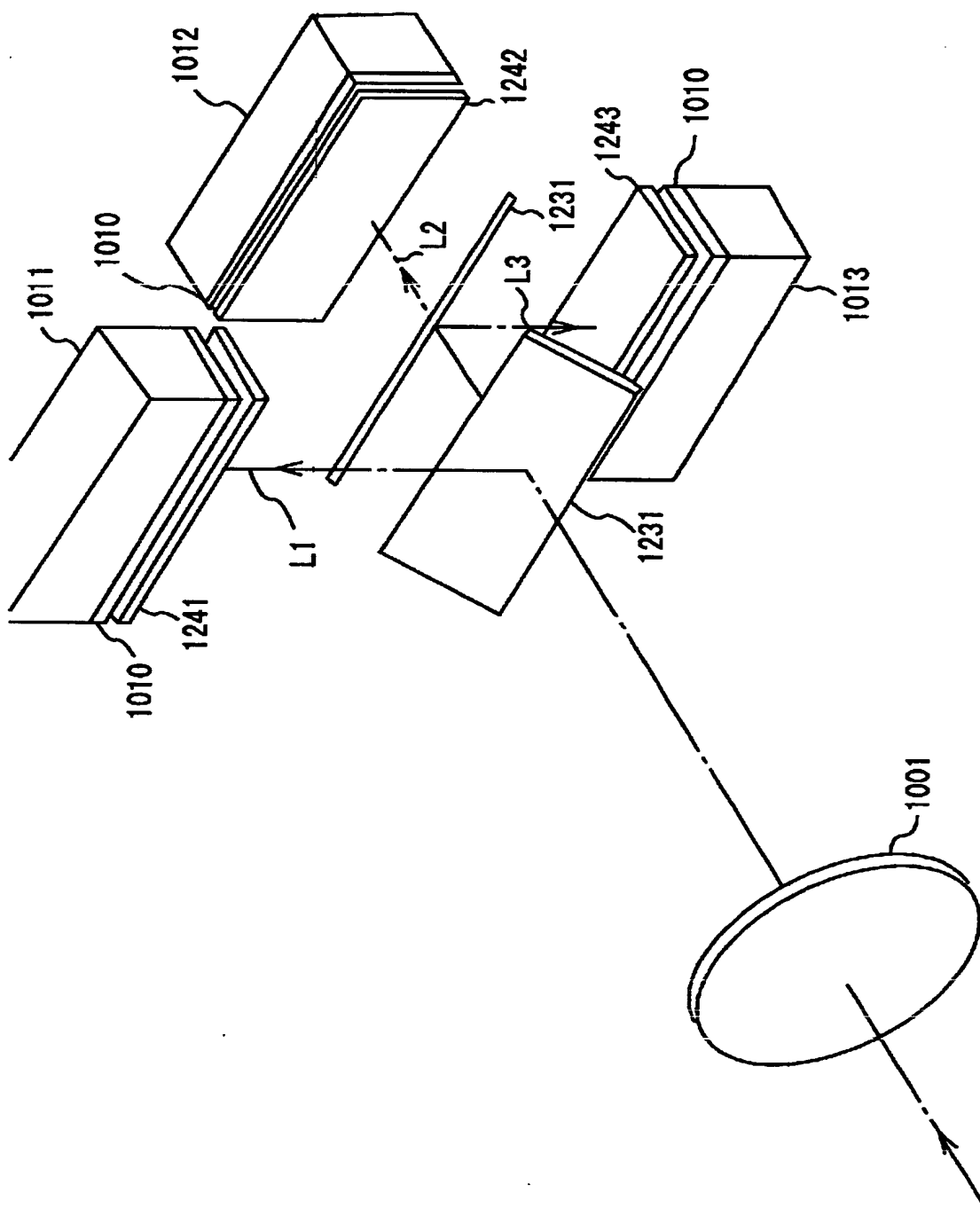
【図12】

図 1 2



【図 13】

図 13



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

従来、複数の蛍光標識を検出する際、励起光を変えては所望の領域を蛍光検出することを繰り返していた。このため蛍光標識の種類が多くなると、その分検出に時間がかかっていた。

【解決手段】

複数の蛍光標識が付加されたDNAサンプルに複数の波長からなる励起光を照射し、各蛍光強度を分離検出する際、励起光とサンプルの位置とを相対的に所望の領域に亘り1回だけ変化させることにより複数の蛍光標識検出することにより高速検出を行う。

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-097966	
受付番号	50100466278	
書類名	特許願	
担当官	第一担当上席	0090
作成日	平成13年 4月 2日	

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成13年 3月30日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005108]

1. 変更年月日 1990年 8月31日

・ [変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
氏 名 株式会社日立製作所